

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-330287

(43)公開日 平成4年(1992)11月18日

(51)Int.Cl. ⁶ C 12 N 15/74 // (C 12 N 15/74 C 12 R 1:01)	識別記号 8828-4B	序内整理番号 C 12 N 15/00	F I	技術表示箇所 A
--	--------------	---------------------	-----	----------

審査請求 未請求 請求項の数2(全3頁)

(21)出願番号 特願平3-37546	(71)出願人 000003953 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号
(22)出願日 平成3年(1991)3月4日	(72)発明者 湯 不二夫 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日 東化学工業株式会社中央研究所内
	(72)発明者 橋本 好弘 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日 東化学工業株式会社中央研究所内
	(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 環状プラスミド

(57)【要約】

【構成】 その大きさが約7.0kbであり、制限酵素切断部位数がSphI:1, KpnI:2, BgIII:2, SacI:3であることを特徴とするRhodococcus属に属する微生物由来の環状プラスミド。

【効果】 本発明の環状プラスミドは工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベクターとして有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 その大きさが約7.0kbであり、制限酵素切断部位数がSphI:1, KpnI:2, BgIII:2, SacI:3であることを特徴とするRhodococcus属に属する微生物由来の環状プラスミド。

【請求項2】 微生物がRhodococcus rhodochrous ATCC 4001である請求項1記載の環状プラスミド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規なプラスミドに関する、更に詳しく述べるRhodococcus属に属する微生物に由来する新規なプラスミドに関する。

【0002】

【従来の技術】 Rhodococcus属に属する微生物は、ニトリル類を水和して対応するアミド類または酸を生産するための微生物触媒として知られており、またRhodococcus rhodochrous種に属する微生物が極めて高性能なニトリル水和活性を有することが知られている。このような状況下、Rhodococcus属の宿主ベクター系の開発が以前から期待されていた。しかしながら、Rhodococcus属に属する菌株についてはこれらの微生物を宿主とするに適したベクターの開発は遅れており、Rhodococcus spにおいてプラスミドの見い出された株はRhodococcus sp. H13-A 株(J. Bacteriol. 170, 638-645(1988))や本発明者らがさきに特許出願したRhodococcus rhodochrous ATCC 4276等(特願平2-270377)をはじめわずか数株にすぎない。そのため、更にRhodococcus属に属する菌株から工業的に利用し得る微生物を育種、改良するための新しいベクターの開発が強く望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは上記事情に鑑み、Rhodococcus属に属する菌株を用いて工業的に有用な宿主-ベクター系を開発すべく観察研究を行った結果、Rhodococcus属に属する微生物から工業的に有用な宿主-ベクター系におけるベクターとして利用可能な新規な環状プラスミドを見い出し、本発明を完成した。

【0004】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は、その大きさが約7.0kbであり、制限酵素切断部位数がSphI:1, KpnI:2, BgIII:2, SacI:3であることを特徴とする、Rhodococcus属に属する微生物由来の環状プラスミドである。本発明のプラスミドは、具体的には、例えばRhodococcus rhodochrous ATCC 4001から得ることができ、大きさが約7.0kbで且つ下記表1に示す制限酵素に対する分解特性を有する新規な環状プラスミドである。以下のプラスミドを、pRC010と称する。

【0005】

【表1】

2

表1

制限酵素	切断部位数	生成断片のサイズ(kb)
SphI	1	7.0
KpnI	2	4.0, 3.0
BgIII	2	6.5, 0.5
SacI	3	4.2, 2.0, 0.8

【0006】

【実施例】 次に本発明を実施例により具体的に示す。

【0007】

【実施例1】

プラスミドの分離精製法

Rhodococcus rhodochrous ATCC 4001を400mlのM Y培地(ポリペプトン0.5%, パクトイーストエキス0.3%, マルツエキス0.3%, グルコース1%)にて培養を開始する。OD660=0.15~0.2の頃にベニシリンG 0.5U/mlを加えた。OD660=1.0まで培養後、遠心により菌体を回収する。菌体を40ml TES(10mM Tris-HCl(pH8)-10mM NaCl-1mM EDTA)緩衝液で洗浄後、11mlの50mM Tris-HCl(pH8)-12.5% シューコロース-100mM NaCl-1mg/mlリゾチームに懸濁し、37℃にて3時間振盪した。これに0.6mlの0.5M EDTA、2.4mlの5M NaCl、4.4mlの4% SDS-0.7M NaClを順次加え、緩やかに混合し氷上で18時間静置した。4℃にて65,000×g 1時間遠心し上清を得、これに50%ポリエチレンリコール6,000を4.6ml加える。氷上で3時間静置し、1,000×g 5分遠心する。沈殿物を5mlのTES緩衝液に溶解し、CsClを7.5g、1.5mg/ml臭化エチジウム-TES緩衝液を2ml加え混合した。この溶液を42時間130,000×gの密度勾配遠心分離にかけた。

【0008】 紫外線照射により検出されたプラスミド画分を分取した後、n-ブタノールで処理し臭化エチジウムを除いた。TES緩衝液(10mM Tris-HCl(pH8)-1mM EDTA)に対して透析後、エタノール沈殿により精製プラスミド画分を得た。これを0.7%アガロースゲル電気泳動に供し、ゲルを臭化エチジウムで染色することによりプラスミドの存在を確認した。

プラスミドの分子量測定法

上記のように調製したプラスミドの一部を0.7%アガロースゲル電気泳動に供した。この際、サイズマーカーとして大腸菌プラスミドpUC18、pUC118、pBR322(各々2.69kb, 3.16kb, 4.3

6 kb) を同時に泳動した。Rhodococcus rhodochrous ATCC 4001 から得られたプラスミドは pRC010 と命名され、アガロースゲル電気泳動から求められた大きさは約 7.0 kb であった。

各種制限酵素による切断特異性

上記のように調製したプラスミドの一部を各種制限酵素と反応させ、反応終了後、反応液を 0.7% アガロースゲル電気泳動および 5% アクリルアミドゲル電気泳動により分析した。サイズマーカーとしてはラムダファージ DNA の Hind III 消化物および Pst I 消化物を用い、プラスミドの各制限酵素断片のサイズを算出した。pRC010 は表 2 のような制限酵素切断特性を示した。

【0009】

【表 2】

表 2

制限酵素 切断部位数 生成断片のサイズ(kb)

20

SphI	1	7.
KpnI	2	4.0, 3.0
BglII	2	6.5, 0.5
SacI	3	4.2, 2.0, 0.
BamHI	0	-
BclI	0	-
EcoRI	0	-
HindIII	0	-
ClaI	0	-
PvuII	0	-
PstI	0	-
SalI	0	-
SmaI	0	-

30

【図 1】

